

PCT
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



2

BEST AVAILABLE COPY

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C12N 15/31, 1/21, C12P 21/00, C12N 1/20, 15/11	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/15246 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. Mai 1996 (23.05.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01555 (22) Internationales Anmeldedatum: 7. November 1995 (07.11.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 40 118.3 11. November 1994 (11.11.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH [DE/DE]; Wilhelm-Johnen-Strasse, D-52425 Jülich (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): REINSCHIED, Dieter [DE/CA]; 2267 West 7th Avenue, Vancouver, British Columbia V6K 1Y3 (CA). EIKMANN, Bernhard [DE/DE]; Kopernikusstrasse 33, D-52428 Jülich (DE). SAHM, Hermann [DE/DE]; Wendelinusstrasse 71, D-52428 Jülich (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CN, JP, KR, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>	

(54) Title: DNA WHICH REGULATES GENE EXPRESSION IN CORYNE-FORM BACTERIA

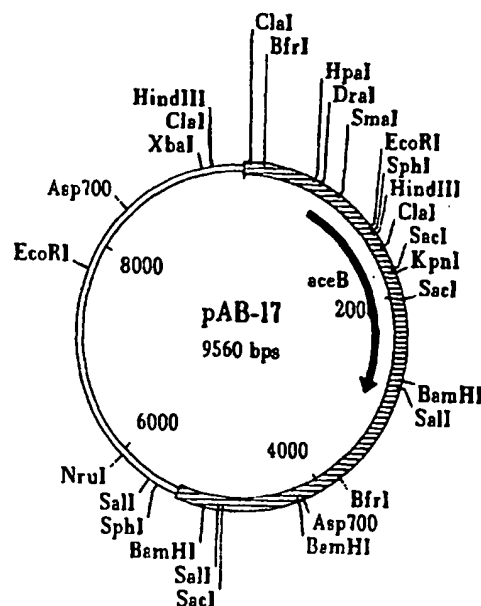
(54) Bezeichnung: DIE GENEXPRESSION IN CORYNEFORMEN BAKTERIEN REGULIERENDE DNA

(57) Abstract

The invention concerns a DNA fragment located in front of the malate synthase gene of a coryne-form bacterium and isolated from the latter. Any structural gene which codes for a protein can be inserted after this DNA fragment. After transformation of such a construct into a coryne-form bacterium, expression of the structural gene inserted after the DNA fragment is regulated. The invention also concerns a process for synthesising any protein by culturing a transformed coryne-form bacterium. A bacterium of this type contains in replicable form a DNA fragment isolated from the malate synthase gene of a coryne-form bacterium, and after which the structural gene which codes for the protein to be synthesised is inserted. Since expression of the structural gene which codes for the protein to be synthesised is regulated by the DNA located in front of it, the structural gene is expressed and the desired protein synthesised as soon as a suitable inducing agent is added to the medium.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung bezieht sich auf ein DNA-Fragment, das dem Malatsynthase-Gen eines coryneformen Bakteriums vorgeschaltet und von diesem isoliert ist. Diesem DNA-Fragment kann ein beliebiges, für ein Protein kodierendes Strukturgen nachgeschaltet werden. Nach Transformation eines solchen Konstrukts in ein coryneformes Bakterium wird die Expression des dem DNA-Fragment nachgeschalteten Strukturgens reguliert. Des weiteren bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zur Synthese eines beliebigen Proteins durch Kultivierung eines transformierten coryneformen Bakteriums. Ein solches Bakterium enthält in replizierbarer Form ein vom Malatsynthasegen eines coryneformen Bakteriums isoliertes DNA-Fragment, dem das für das zu synthetisierende Protein kodierende Strukturgen nachgeschaltet ist. Da die Expression des für das zu synthetisierende Protein kodierenden Strukturgens durch das vorgeschaltete DNA-Fragment reguliert ist, wird das Strukturgen exprimiert und das gewünschte Protein synthetisiert, sobald dem Medium ein entsprechender Induktor zugesetzt wird.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

B e s c h r e i b u n g

Die Genexpression in coryneformen Bakterien regulierende DNA

Die Erfindung betrifft eine die Genexpression in coryneformen Bakterien regulierende DNA.

5 Jeder Organismus ist im Laufe des Wachstums darauf angewiesen, Zellsubstanz neu zu synthetisieren. Dabei werden zahlreiche Zellbestandteile, wie z. B. Aminosäuren und Porphyrine, ausgehend von Metaboliten des Citrat-Zyklus neu gebildet. Dies setzt voraus, daß die dem Citrat-Zyklus
10 entzogenen Metabolite neu synthetisiert werden. Bei Wachstum von Mikroorganismen auf Acetat, Ethanol oder Fettsäuren werden Metabolite des Citrat-Zyklus durch eine als Glyoxylat-Zyklus bezeichnete Reaktionsfolge neu synthetisiert (Kornberg, Biochem J 99 (1966) 1-11) Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Zyklus sind die
15 Enzyme Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase. Da die genannten Enzyme in vielen Organismen ausschließlich bei Wachstum auf Acetat, Ethanol bzw. Fettsäuren, nicht jedoch bei Wachstum auf Kohlenhydraten benötigt werden, wird die Aktivität bzw. die Neusynthese der beiden Enzyme häufig durch die
20 Kohlenstoffquelle des Medium reguliert.

Aufgrund ihrer keulenförmigen Gestalt wird *Corynebacterium glutamicum* und die mit diesem nah verwandten Arten
25 *C. melassecolae*, *Brevibacterium flavum* und *B. lactofermentum* zu den coryneformen Bakterien gezählt. Weiterhin gehören die

genannten Arten zu den 'Glutaminsäure-Bakterien', da sie in der Lage sind, unter gewissen Wachstumsbedingungen große Mengen an Glutamat in das Medium auszuscheiden. Die genannten Mikroorganismen sind von großem industriellen Interesse, da sie für die Herstellung von Aminosäuren, Purinen und Proteinen eingesetzt werden können. Für *C. glutamicum*, *C. melassecola*, *B. flavum* und *B. lactofermentum* konnte Wachstum auf Acetat bzw. Ethanol bereits nachgewiesen werden und es wurde gezeigt, daß sie einen Glyoxylat-Zyklus, d.h. auch die Enzyme Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase, besitzen (Für einen Überblick siehe: Kinoshita, Amino acids, in Biology of industrial organisms, 1985, pp. 115-142, Benjamin/cummings Publishing).

Trotz langjähriger industrieller Anwendung dieser Organismen wurden erst in jüngerer Vergangenheit molekularbiologische Methoden entwickelt, mit deren Hilfe coryneforme Bakterien für angewandte Zwecke gezielt genetisch verändert werden können. In der Regel werden dazu die zu klonierenden Gene unter Kontrolle ihrer eigenen Promotoren auf Vektoren kloniert, die in hoher Kopienzahl in coryneformen Bakterien vorliegen. Dabei zeigte sich in mehreren Fällen, daß eine starke Überexpression einzelner Gene sich nachteilig auf das Wachstum coryneformer Bakterien und somit auf die Produktion gewünschter Produkte auswirkte. Dies hatte seine Ursache darin, daß die Überproduktion eines entsprechenden Genprodukts zu toxischen Effekten innerhalb des Stoffwechsels der Zelle führte und somit das Wachstum dieser Zelle verlangsamte. Beispiele für derartige Fälle ist die homologe Überexpression von mutierten Genen, die für deregulierte Enzyme kodieren, d. h. solche Enzyme, deren

Aktivität keiner Endprodukt-Hemmung mehr unterliegt, z.B. die homologe Überexpression des *hom1*-Gens, das für eine deregulierte Homoserin-Dehydrogenase kodiert. (Reinscheid et al., Appl Environm Microbiol 60 (1994), 126-132). Es sind aber
5 auch Fälle bekannt, in denen die Überexpression eines nicht-mutierten Gens im homologen System für das Wachstum von *C. glutamicum* schädlich ist (z.B. Eikmanns et al., Microbiology 140 (1994), 1817-1828). Darüberhinaus kommt es häufig zu Problemen, wenn Gene, die nicht aus coryneformen Bakterien
10 stammen, in diesen überexprimiert werden sollen. Um in coryneformen Bakterien ein gewünschtes Gen zu exprimieren, ohne eine Wachstumshemmung durch das entsprechende Genprodukt in Kauf nehmen zu wollen, existieren verschiedene Möglichkeiten: Ein gewünschtes Gen kann in einfacher Kopienzahl in das
15 Chromosom von coryneformen Bakterien integriert werden. Da nur eine Kopie dieses Gens in dem Organismus vorliegt, treten in der Regel keine toxischen Effekte durch das entsprechende Genprodukt auf. Eine Schwäche dieses Verfahrens liegt in der arbeitsaufwendigen Methodik, um das gewünschte Ziel zu
20 erreichen. Darüberhinaus wird durch die einfache Kopienzahl des eingefügten Gens nur selten eine ausreichende Menge von einem gewünschten Stoff gebildet.

Eine Alternative zur Integration eines Gens in das Chromosom
25 von coryneformen Bakterien ist die Klonierung eines Gens auf einem Vektor mit niedriger Kopienzahl in coryneformen Bakterien. Dies hat den Vorteil, daß das entsprechende Genprodukt in relativ geringer Menge gebildet wird und damit meistens nicht toxisch für die Zelle ist. Allerdings ist auch

in diesem Falle die relativ geringe Menge an gebildetem Genprodukt für biotechnologische Anwendungen ein Nachteil.

Es wäre daher wünschenswert, ein gewünschtes Genprodukt in großer Menge nur zu einem bestimmten Zeitpunkt zu bilden, um nachteilige Effekte dieses Genprodukts auf die Produktion bzw. das Wachstum des Organismus zu umgehen. Um dieses Ziel zu erreichen, bietet es sich an, ein gewünschtes Gen ohne seinen eigenen Promotor hinter einen regulierbaren Promotor zu klonieren. Für die regulierbaren *Escherichia coli* Promotoren *lac*, Lambda P_L und *trp* konnte bereits gezeigt werden, daß sie in coryneformen Bakterien zur regulierten Expression verschiedener Gene eingesetzt werden können (Tsuchiya und Morinaga, Bio/Technology 6 (1988) 428-431). Allerdings besitzen diese Promotoren verschiedene Nachteile: Zum einen stammen die genannten Promotoren nicht aus coryneformen Organismen und stellen somit Fremd-DNA dar. Durch Einschleusung eines derartigen Promotors in coryneforme Bakterien werden diese zu rekombinanten Organismen, für welche strengere Sicherheitsbestimmungen gelten. Zum anderen sind die Bedingungen, die jeder der drei Promotoren zur Induktion eines Gens benötigt, für industrielle Zwecke relativ uninteressant. So benötigt der *lac*-Promotor zur Induktion eines Gens den verhältnismäßig teuren Stoff IPTG, welcher eine großtechnische Anwendung dieses Promotors unrentabel macht. Der Promotor Lambda P_L wird durch Hitze aktiviert. Hitze schadet aber nicht nur dem Organismus sondern könnte sich auch auf das gebildete Produkt schädlich auswirken, so daß dieser Promotor von keinerlei industriellem Interesse für coryneforme Bakterien

ist. Der trp-Promotor wird durch Tryptophan-Mangel aktiviert. Da coryneforme Bakterien in der Regel nicht unter Tryptophan-Mangel leiden, würde die Verwendung dieses Promotors die Herstellung coryneformer Tryptophan-Mangel-Mutanten voraussetzen. Da die Gewinnung solcher Mutanten relativ aufwendig ist, hat auch der trp-Promotor bislang keinen Einzug in die biotechnologische Nutzung bei coryneformen Bakterien gefunden.

10 Den Idealfall für einen regulierbaren Promotor stellte ein coryneformer Promotor dar, der durch einen leicht verfügbaren, preiswerten Stoff reguliert wird. Der bislang einzige beschriebene coryneforme Promotor ist der des Gens für Isocitrat-Lyase (EP-OS 0 530 765). Dieser Promotor führt zur
15 Expression von Genen, solange sich kein Zucker im Medium befindet. Da jedoch in den meisten Fermentationsmedien Zucker als Kohlenstoffquelle eingesetzt werden, wäre es sinnvoll, einen regulierbaren Promotor zu erhalten, der auch in Anwesenheit von Zuckern mit einem preiswerten Induktor zur
20 Expression eines Gens führt.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein DNA-Fragment bereit zu stellen, das unabhängig von der Kohlenstoffquelle des Kulturmediums eine regulierte Expression verschiedener Gene in
25 coryneformen Bakterien ermöglicht.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein dem Malatsynthase-Gen eines coryneformen Bakteriums vorgeschaltetes und von diesem isoliertes DNA-Fragment gelöst, das die Expression eines
30 beliebigen, für ein Protein kodierenden, dem DNA-Fragment

nachgeschalteten

Strukturgens nach Einbau in einen Vektor und Transformation in ein coryneformes Bakterium reguliert.

- 5 Es konnte ermittelt werden, daß die Expression des Malatsynthase-Gens in coryneformen Bakterien durch die Anwesenheit von Induktoren, wie beispielsweise Lactat, Pyruvat und/oder Acetat induzierbar ist. Diese Induktion insbesondere durch Acetat erfolgt auch dann, wenn sich noch andere
- 10 Kohlenstoffquellen im Medium befinden. Sogar in Anwesenheit von Zuckern bzw. in Komplexmedium erfolgt eine signifikante Induktion durch Acetat.

- Nach Isolierung eines dem Malatsynthase-Gen eines
- 15 coryneformen Bakteriums vorgeschalteten DNA-Fragments wird diesem ein beliebiges, für ein zu synthetisierendes Protein kodierendes Strukturgen nachgeschaltet, dieses Konstrukt in einen Vektor ligiert und anschließend in ein coryneformes Bakterium transformiert. Während der Kultivierung eines solchen
- 20 Transformanten wird zu einem beliebigen Zeitpunkt dem Medium ein Induktor, wie Lactat, Pyruvat, vorzugsweise Acetat, zugegeben, worauf das Strukturgen zum gewünschten Zeitpunkt exprimiert und somit das gewünschte Protein synthetisiert wird. Das erfindungsgemäß bereitgestellte DNA-Fragment erlaubt damit
- 25 die regulierte Expression von verschiedenen Genen in coryneformen Bakterien. Da die isolierte DNA selbst aus einem coryneformen Bakterium stammt, erfolgt die oben beschriebene Regulation innerhalb eines homologen Systems. Der erfindungsgemäße DNA-Bereich bietet daher zum ersten Mal die

Möglichkeit, in einem homologen System, durch einen preiswerten Induktor wie Acetat und unabhängig von der Zusammensetzung des Fermentationsmediums Gene in coryneformen Bakterien reguliert zu exprimieren.

5

Vorzugsweise wird ein dem Malatsynthase-Gen von *Corynebacterium glutamicum* vorgeschaltetes und von diesem isoliertes DNA-Fragment bereitgestellt; d.h. aus *C. glutamicum* wurde das Gen für Malatsynthase (*aceB*) zusammen mit den für die

10 Expression und Regulation benötigten Strukturen isoliert und sequenziert. Die DNA-Sequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz ist in Tab. 2 dargestellt. In der Tab. 2 ist die Ribosomenbindungsstelle des *aceB*-Gens unterstrichen und mit 'RBS' gekennzeichnet. Der potentielle Terminator der

15 Transkription von *aceB* ist durch antiparallele Pfeile dargestellt.

Es konnte festgestellt werden, daß der vor dem Malatsynthase-Gen befindliche DNA-Bereich von Nucleotid 1 bis

20 574 gemäß Tab. 2 zur regulierten Expression auch anderer Gene führt.

Ausführungsbeispiel:

1. Untersuchungen zur Aktivität der Malatsynthase in
- 5 Zellextrakten von *Corynebacterium glutamicum* nach Wachstum auf verschiedenen Medien.

In Extrakten des *C. glutamicum*-Stammes ATCC 13032 (Wildtyp) wurde die Aktivität der Malatsynthase (MSY) nach Wachstum auf

10 verschiedenen Medien bestimmt, um den Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Aktivität dieses Enzyms zu untersuchen. Es wurden dazu die Zellen für 14 h in 10 ml 2xTY-Vollmedium (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) bei 30°C

15 unter Schütteln (120 UpM) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert, einmal mit Puffer pH 6,8 (0,1 M Kaliumphosphat) gewaschen und in 1 ml des gleichen Puffers aufgenommen. Mit der erhaltenen Zellsuspension wurde anschließend jeweils 60 ml Medium beimpft um eine optische

20 Dichte (OD₆₀₀) von 1,0 zu erhalten. Bei den verwendeten Medien handelte es sich um 2xTY-Vollmedium oder es wurde CgC-Minimalmedium (Eikmanns et al., Appl Microbiol Biotechnol 34 (1991) 617-622) mit jeweils 1% an Glukose, Acetat, Pyruvat, Laktat, Citrat, Succinat, Fumarat bzw. Glutamat als

25 Kohlenstoffquelle verwendet. Die Kulturen wurden erneut bei 30°C inkubiert und die OD₆₀₀ wurde verfolgt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 8 - 10 wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet, einmal mit Puffer pH 7,6 (50 mM Tris/HCl) gewaschen, in 1 ml des gleichen Puffers aufgenommen, und durch

30 Ultraschallbehandlung in einem Branson-Sonifier W25C (10

Minuten, gepulst mit einem Intervall von 20% und einer Leistung von 30 Watt) desintegriert. Zur Abtrennung der Zelltrümmer wurde das Homogenat für 30 Minuten bei 13000 UpM in einer Sigma 2K15 Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert, und anschließend der
5 klare Überstand (Rohextrakt) zur Bestimmung der MSY-Aktivität verwendet.

Der Enzymtest enthielt in einem Endvolumen von 1,0 ml, 50 mM Tris/HCl, (pH 7,6), 40 mM MgCl₂, 2 mM Na-Glyoxylat, 0,15 mM
10 Acetyl-CoenzymA und Rohextrakt. Der Ansatz wurde bei 30°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 2 Minuten wurde die Extinktionsabnahme bei 232 nm bestimmt, die sich aufgrund der Spaltung der Thioesterbindung von Acetyl-CoA ergibt. Der Extinktionskoeffizient von Acetyl-CoA bei 232 nm liegt bei 4,5
15 mM⁻¹ cm⁻¹ (Stadtman, Methods in Enzymology, Vol. 3, 1957, New York: Academic Press). Der Proteingehalt der Rohextrakte wurde mit Hilfe der Biuret-Methode (Bradford, Anal Biochem 72 (1976) 246-254) bestimmt. Die erhaltenen spezifischen Malatsynthase-Aktivitäten sind in Tabelle 1 aufgeführt.

20 Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, liegt die Aktivität der MSY bei Wachstum auf 2xTY-Vollmedium sowie auf CgC-Minimalmedium mit Glucose, Citrat, Succinat, Fumarat bzw. Glutamt als Kohlenstoffquelle bei ungefähr 0,04 U/mg Protein. Auf CgC-Minimalmedium mit Lactat bzw. Pyruvat als Kohlenstoffquellen
25 steigt die MSY-Aktivität auf Werte von 0,173 U/mg Protein bzw. 0,192 U/mg Protein an. Die höchste MSY-Aktivität wird mit 2,212 U/mg Protein bei Wachstum auf CgC-Minimalmedium mit Acetat beobachtet. Wurde Acetat den oben genannten Medien zugesetzt, so führte dies ebenfalls zu einem starken MSY-Aktivitätsanstieg
30 auf Werte von 0,500 U/mg Protein bis 1,330 U/mg Protein. Diese

Ergebnisse zeigen, daß in *C. glutamicum* die Aktivität der MSY durch die Kohlenstoffquelle des Mediums reguliert wird.

5 2. Isolierung und Subklonierung des MSY-Gens aus
Corynebacterium glutamicum.

Zur Isolierung des MSY-Gens (*aceB*) aus *C. glutamicum* wurde basierend auf dem Cosmid pH79 (Hohn und Collins, Gene 11
10 (1980) 291-298) eine corynebakterielle Cosmid-Genbank nach bekannter Methodik (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) angelegt. Dazu wurde aus *C. glutamicum* chromosomale DNS isoliert (Eikmanns et al., Microbiology 140 (1994) 1817-1828)
15 und mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* partiell verdaut. Nach Ligation der erhaltenen Fragmente in die *Bam*HI-Schnittstelle des Cosmids pH79 wurde der Ansatz in die Proteinhülle des Bakteriophagen Lambda verpackt und der *E. coli*-Stamm ED8654 (Murray et al. Mol Gen Genet 150 (1977) 53-61) damit
20 transfiziert. Die Verpackung der rekombinanten Cosmide in die Proteinhülle des Phagen Lambda erfolgte nach einer Methode von Sternberg et al. (Gene 1 (1979) 255-280), die Transfektion von *E. coli* ED8654 nach einer Methode von Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring
25 Harbour Laboratory Press). Aus insgesamt 30 der erhaltenen rekombinanten *E. coli*-Klone wurden die entsprechenden Cosmide isoliert (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) und einer Restriktionsanalyse mit dem Enzym *Hind*III unterzogen. Es zeigte

sich, daß 24 der untersuchten Cosmide Inserts besaßen, und daß die Inserts Größen von ungefähr 35 kb aufwiesen. Insgesamt 2200 Cosmid-tragende *E. coli*-Klone wurden vereinigt und aus diesem Gemisch nach bekanntem Verfahren (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) die Cosmid-DNA präpariert.

Zur Isolierung des *aceB*-Gens aus *C. glutamicum* wurde die Cosmid-Genbank in die MSY-defekte *E. coli*-Mutante DV21AO5 (Vanderwinkel und De Vlieghe Eur J Biochem 5 (1968) 81-90) nach bekanntem Verfahren (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) transformiert. Die Mutante DV21AO5 ist aufgrund ihres MSY-Defektes nicht mehr in der Lage, auf Acetat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Nach Transformation der Cosmid-Genbank in diese Mutante wurden insgesamt 1000 Klone erhalten. Von diesen zeigten auf M9-Minimalmedium (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle insgesamt drei Klone Wachstum. Nach Isolierung der entsprechenden Cosmide (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) aus diesen Klonen und erneuter Transformation in die *E. coli*-Mutante DV21AO5 waren die resultierenden Klone erneut in der Lage, auf M9-Medium mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Dies läßt vermuten, daß auf den drei Cosmiden das *aceB*-Gen aus *C. glutamicum* lokalisiert ist.

Um das *aceB*-Gen aus *C. glutamicum* auf einem kleineren Fragment einzugrenzen, wurden die drei Cosmide mit dem

Restriktionsenzym *Sau3A* partiell verdaut und nach bekannter Methode (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) auf einem 0,8%igen Agarosegel im elektrischen Feld aufgetrennt. Fragmente

5 im Größenbereich von 3,0 kb bis 6,0 kb wurden durch Elektroelution (Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring Harbour Laboratory Press) aus dem Gel isoliert und in die *Bam*HI-Schnittstelle des Vektors pHCYC184 (Chang und Cohen, J Bacteriol (1978) 1141-

10 1156) ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurde *E. coli* DV21A05 transformiert und die erhaltenen Transformanten wurden erneut auf ihre Fähigkeit untersucht, auf Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Es konnten auf diese Weise neun Klone isoliert werden, deren Plasmide der Mutante DV21A05

15 Wachstum auf Acetat erlaubten. Aus den jeweiligen rekombinanten Stämmen wurden die entsprechenden Plasmide isoliert und einer Restriktionskartierung unterzogen. Die Restriktionskarte von einem der Plasmide, pAB-17, ist in Figur 1 dargestellt. Aus diesem Plasmid wurde nach bekanntem Verfahren das für die MSY

20 kodierende DNS-Fragment durch *Bfr*I-*Pvu*I-Restriktion als 3 kb Fragment isoliert und in den *C. glutamicum*/*E. coli*-Pendelvektor pEK0 (Eikmanns et al., Gene 102 (1991) 93-98) ligiert. In Abhängigkeit von der Orientierung des Inserts im Vektor wurden die neu konstruierten Plasmide als pEKB1a und pEKB1b

25 bezeichnet. Die Restriktionskarten beider Plasmide sind in Figur 2 präsentiert.

3. Analyse der Nukleotidsequenz des MSY-Strukturgens und angrenzender Bereiche

Für die Sequenzierung wurden zwei sich überlappende
5 Teilfragmente, ein 1,6 kb *BfrI*-*RpnI* und ein 1,8 kb *SphI*-*PvuI*-
Fragment, aus dem Plasmid pAB-17 nach bekannter Methode
isoliert. Die überhängenden Enden beider Fragmente wurden mit
Klenow-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt (Sambrook et al.,
Molecular Cloning, A Laboratory Handbook, 1989, Cold Spring
10 Harbour Laboratory Press) und in geeignete Schnittstellen des
Plasmids pUC18 (Vieira und Messing, Gene 19 (1982) 259-268)
ligiert. Die so erzeugten Plasmide wurden benutzt, um nach der
Methode von Henikoff (Gene 28 (1984) 351-359)
Deletionskonstrukte zu erzeugen, die anschließend durch die
Kettenabbruch-Sequenziermethode (Sanger et al., Proc Natl Acad
15 Sci USA, 74 (1977) 5463-5467) sequenziert wurden. Die dabei
erhaltene, gesamte Sequenz des 3 kb *BfrI*-*PvuI*-Fragmentes ist in
Tabelle 2 dargestellt. Außerdem ist in Tabelle 2 die von dem
aceB-Gen abgeleitete Proteinsequenz für die MSY aus *C.*
glutamicum, die vor dem Gen befindliche Ribosomenbindungsstelle
20 und die hinter dem Gen liegende Terminationsstruktur für die
Transkription abgebildet.

4. MSY-Aktivität von *C. glutamicum*-Stämmen, die das MSY-Gen auf 25 Plasmid tragen.

Durch Elektroporation (Liebl et al., FEMS Microbiol Lett 65
(1989) 299-304) wurden die Plasmide pEKB1a und pEKB1b in *C.*
glutamicum eingeführt und die resultierenden Stämme als

WT(pEKB1a) und WT(pEKB1b) bezeichnet. Nach bekannter Methode wurden die neu konstruierten *C. glutamicum*-Stämme auf CgC-Minimalmedium mit Glukose, Glukose/Acetat bzw. Acetat als Kohlenstoffquellen bis zu einer OD₆₀₀ von 8-10 gezüchtet, Rohextrakte hergestellt und in diesen die spezifische MSY-Aktivität bestimmt. Die gemessenen MSY-Aktivitäten sind in Tabelle 3 dargestellt.

Die *C. glutamicum*-Stämme WT(pEKB1a) und WT(pEKB1b) zeigen auf allen drei Kohlenstoffquellen jeweils signifikant höhere Aktivitäten als der *C. glutamicum*-Wildtyp (WT) und der *C. glutamicum*-Stamm WT(pEK0), der den Ausgangsvektor pEK0 enthält. Dieses Ergebnis beweist, daß auf dem 3 kb BfrI-PvuI-Fragment das aceB-Gen aus *C. glutamicum* funktionell vorliegt. Nach Wachstum der *C. glutamicum*-Stämme WT(pEKB1a) und WT(pEKB1b) auf CgC-Glukose/Acetat sind deren MSY-Aktivitäten ungefähr achtfach höher als bei Wachstum dieser Stämme auf Glukose. Bei Wachstum der beiden Stämme auf CgC-Minimalmedium mit Acetat als einziger Kohlenstoffquelle ist die MSY-Aktivität sogar 16- bis 18-fach höher als bei Wachstum auf CgC-Glukose. Diese Ergebnisse belegen, daß sich auf dem isolierten Fragment alle zur Expression und Regulation des aceB-Gens benötigten Strukturen, d.h. der Promotor und regulatorische Sequenzen, befinden. Diese Strukturen liegen vor dem aceB-Gen. Da das klonierte Fragment vor dem eigentlichen aceB-Strukturgen noch 584 bp trägt (siehe Tabelle 2), müssen die Strukturen für Expression und Regulation in diesem DNS-Bereich lokalisiert sein.

5. Untersuchungen zur Regulation und Expression des *aceB*-Gens aus *C. glutamicum*.

Um zu beweisen, daß es sich bei der beobachteten Regulation der MSY um Regulation auf genetischer Ebene und nicht um eine Regulation des Enzyms selbst (z.B. durch Inhibition, Aktivierung oder kovalente Modifikation) handelt, wurden Rohextrakte von auf CgC-Minimalmedium mit Glukose gezüchteten *C. glutamicum* WT bzw. WT(pEKBl_a)-Zellen und von auf CgC-Minimalmedium mit Acetat gezüchteten *C. glutamicum* WT(pEKBl_a)-Zellen auf ihr Proteinmuster untersucht. Dazu wurden die genannten Stämme nach bekannter Methode auf den entsprechenden Medien gezüchtet, Rohextrakte hergestellt und diese nach der Methode von Laemmli (Nature 227 (1970) 680-685) unter denaturierenden Bedingungen auf einem 12,5%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Figur 3). Zur Lokalisation der MSY-Proteinbande im Rohextrakt wurde die MSY aus *C. glutamicum* bis zur Homogenität gereinigt (siehe Anhang 1) und parallel zu den Rohextrakten einer Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen unterworfen (Figur 3). Nach Wachstum von *C. glutamicum* WT auf CgC-Acetat erkennt man auf der Höhe der MSY eine deutlich intensivere Proteinbande als nach Wachstum dieses Stammes auf CgC-Glukose. Der Stamm WT(pEKBl_a) zeigt nach Wachstum auf CgC-Acetat eine sehr intensive MSY-Proteinbande. Aus der Intensität dieser Bande kann man abschätzen, daß die MSY in diesem Stamm circa 20% des Gesamtzellproteins ausmacht. Das Ergebnis zeigt, daß die für die Expression und Regulation von *aceB* notwendigen Strukturen, unter induzierten Bedingungen die Neusynthese großer Mengen an Protein herbeiführen. Außerdem

wird durch das Ergebnis deutlich, daß die beobachtete Steigerung der MSY-Aktivität nach Wachstum auf Acetat auf die Neusynthese des MSY-Proteins zurückzuführen ist.

5

6. Test des vor dem aceB-Gen liegenden DNS-Bereiches auf Funktionalität in einem unabhängigen System.

Der DNS-Bereich vor dem aceB-Gen wurde nach bekannten Methoden
10 als 574 bp *BfrI*-*DraI*-Fragment isoliert, die überhängenden Enden
mit Klenow-Polymerase zu glatten Enden aufgefüllt und in die
mit Klenow-Polymerase aufgefüllte *Sall*-Schnittstelle des
Vektors pEKplCm (Eikmanns et al., Gene 102 (1991) 93-98)
ligiert. Dieses Plasmid trägt hinter der Insertionsstelle das
15 Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (*cat*), jedoch ohne
eigenen Promotor, d.h. vom Plasmid pEKplCm kann das *cat*-Gen in
C. glutamicum nicht abgelesen werden. Nach der Ligation des
BfrI-*DraI*-Fragmentes in den Vektor pEKplCm wurde durch
Sequenzierung nach bekannter Methode sichergestellt, daß die
20 Orientierung des *BfrI*-*DraI*-Fragmentes vor dem *cat*-Gen
derjenigen vor dem aceB-Gen entspricht. Das entsprechende
Plasmid wurde als pIWI bezeichnet. Nach Einbringen des Plasmids
pIWI in *C. glutamicum* nach bekannter Methode wurde in diesem
Stamm die Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)
25 nach Wachstum auf CgC-Glukose, CgC-Glukose/Acetat bzw. CgC-
Acetat bestimmt. Dazu wurden die zu untersuchenden Stämme nach
bekannter Methode auf oben genannten Medien bis zu einer OD₆₀₀
8 bis 10 kultiviert, Rohextrakte hergestellt und in diesen die
spezifische CAT-Aktivität nach der Methode von Shaw (Meth

Enzymol 43 (1975) 737-755) bestimmt. Der Test, enthielt in einem Endvolumen von 1,0 ml 100 mM Tris/HCl pH 7,8, 1 mM Acetyl-CoenzymA, 1 mM 5,5-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) und Rohextrakt und wurde mit 2,5 mM Chloramphenicol gestartet. Der
5 Ansatz wurde bei 30°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 2 Minuten wurde die Extinktionszunahme bei 412 nm bestimmt. Der Proteingehalt der Rohextrakte wurde mit Hilfe der Biuret-Methode (Bradford, Anal Biochem 72 (1976) 248-254) bestimmt. Die erhaltenen spezifischen CAT-Aktivitäten sind in Tabelle 4
10 aufgeführt. Während in dem *C. glutamicum* WT unter keiner der getesteten Bedingungen CAT-Aktivität nachzuweisen war, zeigte der rekombinante Stamm *C. glutamicum* WT(pIWI) bei allen Kohlenstoffquellen CAT-Aktivität. Allerdings war die CAT-Aktivität nach Wachstum auf CgC-Glukose etwa 20-fach niedriger
15 als nach Wachstum auf CgC-Glukose/Acetate und sogar 50-fach geringer als nach Wachstum auf CgC-Acetate. Dieses Ergebnis belegt, daß das isolierte 574 bp *BfrI*-*DraI*-Fragment die regulierte Genexpression von Fremdgenen erlaubt. Eine Induktion des Fremdgens erfolgt durch Acetate, selbst in Anwesenheit von
20 Zucker.

Anhang 1.

Reinigung von MSY aus *C. glutamicum*.

- Zur Reinigung von MSY aus *C. glutamicum* wurden 60 ml einer in
5 CgC-Acetat-Medium wachsenden Kultur bei OD₆₀₀ 8 bis 10
verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit 20 ml 50mM
Morpholinoethansulfonsäure (MES)/NaOH pH 6,0 gewaschen und in 1
ml des gleichen Puffers nach Zugabe von 5U/ml DNase, 15 µg/mg
RNase und 100 µM Phenylmethylsulfonyl-Fluorid resuspendiert.
- 10 Aufschluß und Entfernung von Zelltrümmern erfolgte nach bereits
bekannter Methode. Alle Aufreinigungsschritte wurden bei 4°C
durchgeführt. Der Zellextrakt wurde mit 50 mM MES/NaOH pH 6 auf
10 ml verdünnt. Nach 2 h Ultrazentrifugation bei 183.000 x g
wurde der Überstand auf einer FPLC-Anlage mit einer HR5/5
- 15 MonoQ-Anionenaustauschersäule (Pharmacia LKB, Freiburg
Deutschland) chromatographiert. Während der ersten
chromatographischen Aufreinigung wurde die MSY mit einem 0,1 M
bis 0,4 M NaCl-Gradienten in 50 mM MES/NaOH pH 6 eluiert. Für
die zweite Chromatographie wurde der Puffer der partiell
- 20 gereinigten MSY mittels Ultrafiltration von 50 mM MES/NaOH pH 6
zu 50 mM Tris/HCl pH 8 gewechselt. Während der zweiten
chromatographischen Aufreinigung wurde die MSY mit einem 0,2 M
bis 0,5 M NaCl-Gradienten in 50 mM Tris/HCl pH 8 eluiert.
Während beider chromatographischen Auftrennungen wurde eine
- 25 Flußrate von 1 ml/min eingestellt. Der Durchfluß beider
Auftrennungen wurde in jeweils 1 ml Fraktionen gesammelt und
auf MSY-Aktivität getestet. Die Aktivität enthaltenen
Fraktionen wurden jeweils vereinigt.

Tabelle 1: Aktivität der Malat-Synthase (MSY) in Rohextrakten von *Corynebacterium glutamicum* nach Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen

5	Medium	spezifische MSY-Aktivität
		(U/mg Protein)
	2xTY-Vollmedium	0,030
	2xTY-Vollmedium + 1% Acetat	0,840
10	CgC-Minimalmedium (MM) + 1% Glucose	0,040
	CgC-MM + 1% Acetat	2,212
	CgC-MM + 1% Pyruvat	0,192
	CgC-MM + 1% Lactat	0,173
	CgC-MM + 1% Citrat	0,038
15	CgC-MM + 1% Succinat	0,045
	CgC-MM + 1% Fumarat	0,034
	CgC-MM + 1% Glutamat	0,041
	CgC-MM + 1% Acetat + 1% Glucose	0,970
20	CgC-MM + 1% Acetat + 1% Pyruvat	0,730
	CgC-MM + 1% Acetat + 1% Lactat	0,860
	CgC-MM + 1% Acetat + 1% Citrat	0,500
	CgC-MM + 1% Acetat + 1% Succinat	0,920
25	CgC-MM + 1% Acetat + 1% Fumarat	0,910
	CgC-MM + 1% Acetat + 1% Glutamat	1,330

TABELLE 2

1	CTTAAGTGTGATTGGCAATGGGCGGTGCCGACCACAAAGTATAGTAATGCACGTGTCACGTGTTCCAGCGTATGTCATCGGTTTGGC
91	TGGTGGGTGGTTACACATTTGCTCCATCGGGCATTTGGTGGTCAATCGGTTTGGGTTTTTAAAGTTTTIGCGGGGGTGGTCACCCCTGT
181	TGTGAAGTTTGCAAAGTTCTGGCTTCGCAGAAAAAGTGGCGGGGGAGTTGCTAGTACGGAAGTACGGGCAAAATGCTCTGAAATGGGAA
271	AATGCAGGACCCGCAACGTTCCGTAGGTTTCGAAGGTGTGACCTAGATAAAAGTCGGGGTTAGGCGGGGTTAATGACTTGTAAAGTTCG
361	CAAAACCCCTTTTGTGGTGACGGTGATCATTAGTCTGATCACAATCCCAACACGATAAGGGTTGAAATCGAAACGAAGAGTGGCACCTA
451	GATTCAGAGGTAGTCAGAGTGTCTTTCTTAAAGAGTTTTCACAACCGTTAACGGGTAGCCAAACGAAGGATTGCGATTCTTCTGGT
541	YTAGGCACAGGTCACTAATAACCCATGCTTTAAAGGAGCCTTCAATGACTGAACAGGAACGTGTGCTGCTCAGACTGCCGACAAACGCT
	RBS M T E Q E L L S A Q T A D N A
631	GGAACTGACAGCACCGAACCGTTGACCGGGGGGAATGCAGGTTCGAAAGTTCTCTACGACTTGTAAACCGAAGCGGTACCTCCCTCGC
	G T D S T E R V D A G G M Q V A K V L Y D F V T E A V L P R
721	GTGGGTGGATCGGAAAGTTCTGTCCGGATTTCGCGGCCATCGCCGGGACCTCACCCACGCAACCGGAGCTGCTTGCCTGCCCGC
	V G V D A E K F W S G F A A I A R D L T P R N R E L L A R R
811	GATGAAGTGCAGATGCTTATCGACGACTACCAACGCAACAACTCCGGCACCATCGACCAAGAGGGGTACGAGGATTCCTCAAGAAATC
	D E L Q M L I D D Y H R N N S G T I D Q E A Y E D F L K E I
901	GGATACTTGGTTGAGGAGCCAGAGTGCAGAAATCCGTACCCAAACGTCGATACGGAAATCTCCAGCACCGCAGGACCTCAGCTGGTT
	G Y L V E E P E A A E I R T Q N V D T E I S S T A G P Q L V
991	GTTCCAATTCTGAACGCACGCTTCGGCTGAACGCTGCAATGCTCGCTGGGTTCCCTCTACGATGCGTTGTACGGCACCAACGCCATC
	V P I L N A R F A L N A A N A R W G S L Y D A L Y G T N A I
1081	CCAGAACTGATGGCGTGAAGGGCAAGGAGTACAACCCGGTCCGGGGCCAGAGGTTCATCGAGTGGGTGCTGTAATTCCTCGACAGC
	P E T D G A E K G K E Y N P V R G Q K V I E W G R E F L D S
1171	GTTGTCCCACTGGACGGTGTTCGGATGCGGATGTTGAGAAGTACAACATCACCGATGGAAAGTTGCAGCCCCACATTGGAGATAGCGTC
	V V P L D G A S H A D V E K Y N I T D G K L A A H I G D S V

Tabelle 3. Spezifische Aktivität der Malatsynthase (MSY) in Rohextrakten des *C. glutamicum* Wildtyps (WT) und der rekombinanten *C. glutamicum*-Stämme mit den Plasmiden pEK0, pEKB1a und pEKB1b nach Wachstum auf CgC-Minimalmedium mit
 5 Glukose, Glukose/Acetat bzw. Acetat als Kohlenstoffquelle.

<i>C. glutamicum</i> -		spezifische MSY-Aktivität (U/mg Protein)		
Stamm		CgC-Glukose	CgC-Glukose/Acetat	CgC-Acetat
WT		0,040	0,970	2,11
10 WT(pEK0)		0,038	0,954	2,23
WT(pEKB1a)		0,350	3,120	6,22
WT(pEKB1b)		0,374	3,240	6,08

Tabelle 4. Spezifische Aktivität der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) in Rohextrakten des *C. glutamicum* Wildtyps (WT) und des rekombinanten *C. glutamicum*-Stammes WT(pIWI) nach Wachstum auf CgC-Minimalmedium mit Glukose,
5 Glukose/Acetat bzw. Acetat als Kohlenstoffquelle.

<i>C. glutamicum</i> -		spezifische CAT-Aktivität (U/mg Protein)		
Stamm		CgC-Glukose	CgC-Glukose/Acetat	CgC-Acetat
10	WT	0,001	0,001	0,001
	WT(pIWI)	0,026	0,620	1,320

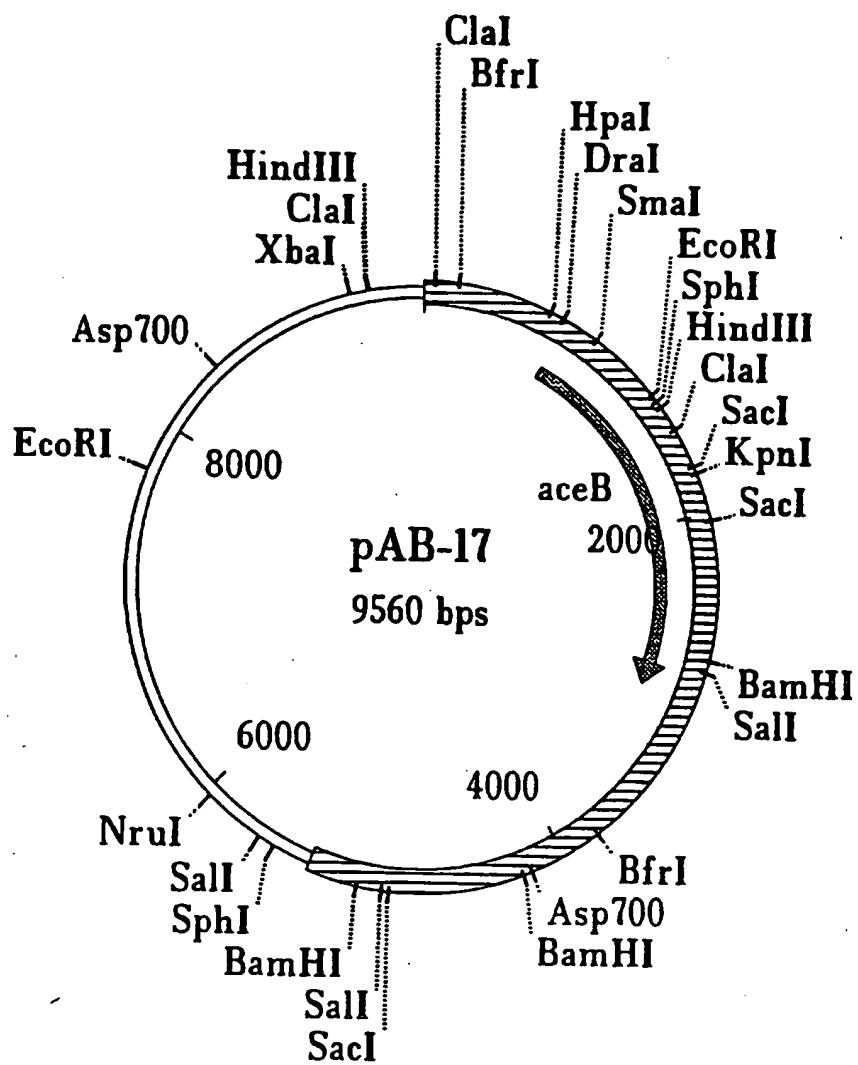
P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Ein dem Malatsynthase-Gen eines coryneformen Bakteriums vorge-
schaltetes und von diesem isoliertes DNA-Fragment, das die
Expression eines beliebigen, für ein Protein kodierenden, dem
DNA-Fragment nachgeschalteten Strukturgens nach Einbau in einen
5 Vektor und Transformation in ein coryneformes Bakterium
reguliert.
2. DNA-Fragment nach Anspruch 1, vom Malatsynthase-Gen von Coryne-
bakterium glutamicum stammend.
- 10 3. DNA-Fragment nach Anspruch 2 mit der Nucleotidsequenz von
Nucleotid 1 bis 574 gemäß Tabelle 2, wobei Tabelle 2 Bestandteil
dieses Anspruchs ist.
4. DNA-Fragment nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 3
15 mit einem beliebigen nachgeschalteten Strukturgen.
5. Vektor, enthaltend ein DNA-Fragment nach einem der Ansprüche
1 bis 4
- 20 6. Rekombinante, coryneforme Zelle, enthaltend in replizierbarer
Form ein DNA-Fragment nach einem der Ansprüche 1 bis 4.
7. Rekombinante, coryneforme Zelle nach Anspruch 6, enthaltend
einen Vektor nach Anspruch 5.
- 25 8. Verfahren zur Synthese eines beliebigen Proteins durch Kulti-
vierung eines transformierten, coryneformen Bakteriums, enthal-
tend in replizierbarer Form ein vom Malatsynthase-Gen eines
coryneformen Bakteriums isoliertes DNA-Fragment, dem das für
30 das zu synthetisierende Protein kodierende Strukturgen nachge-
schaltet ist und das die Expression des für das zu synthetisie-
rende Protein kodierende Strukturgen reguliert, in einem
Medium, dem ein Induktor zugegeben wird, worauf das Strukturgen

exprimiert und somit das gewünschte Protein synthetisiert wird.

9. Verfahren nach Anspruch 8,
5 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
 daß dem Kulturmedium als Induktor Lactat, Pyruvat, vorzugsweise
 Acetat zugegeben wird.

Fig. 1



2/4

Fig. 2

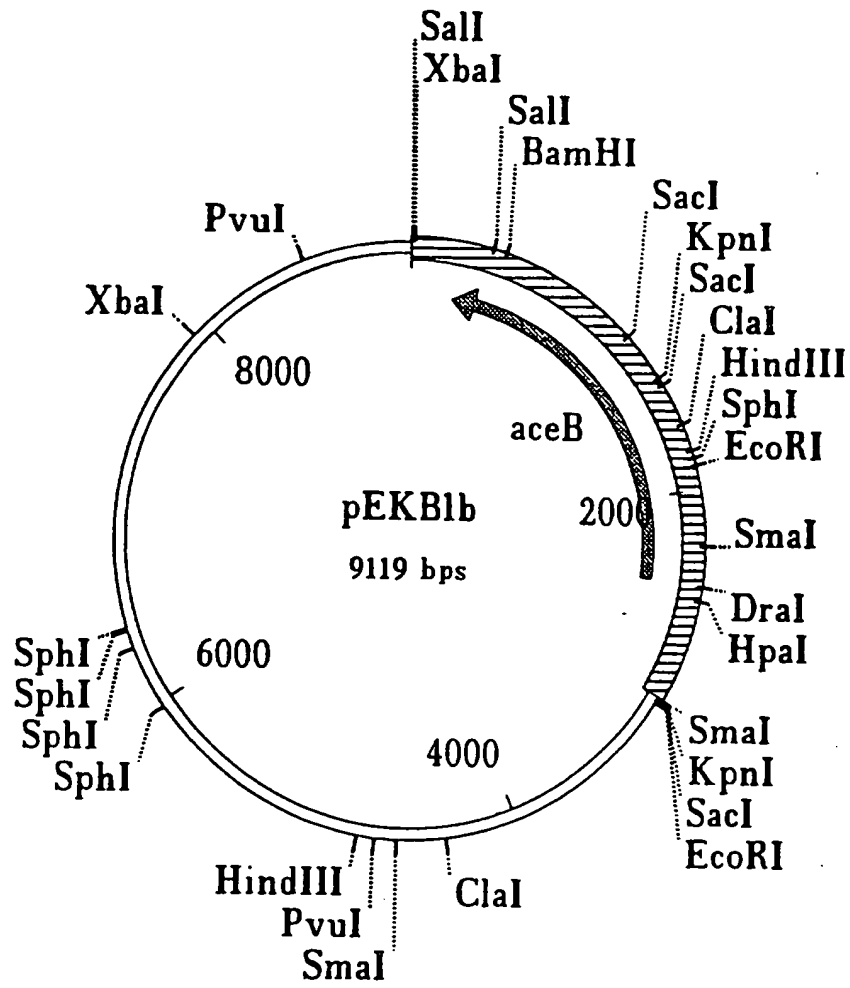
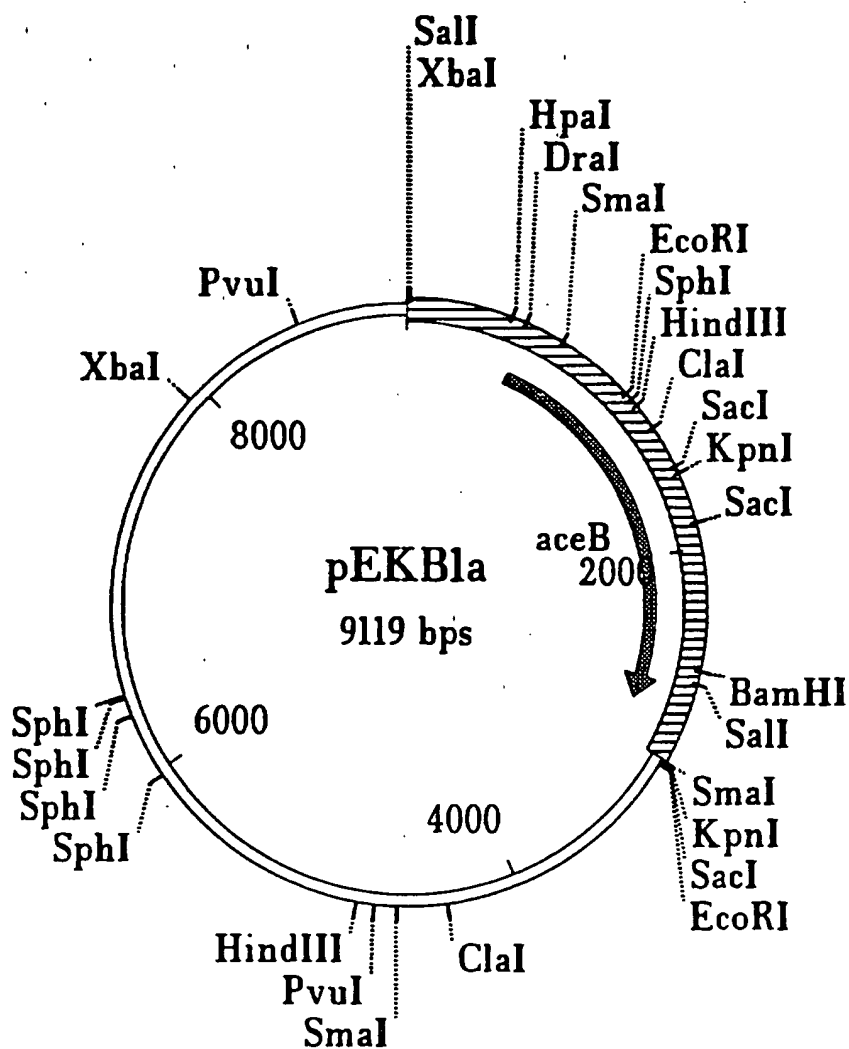
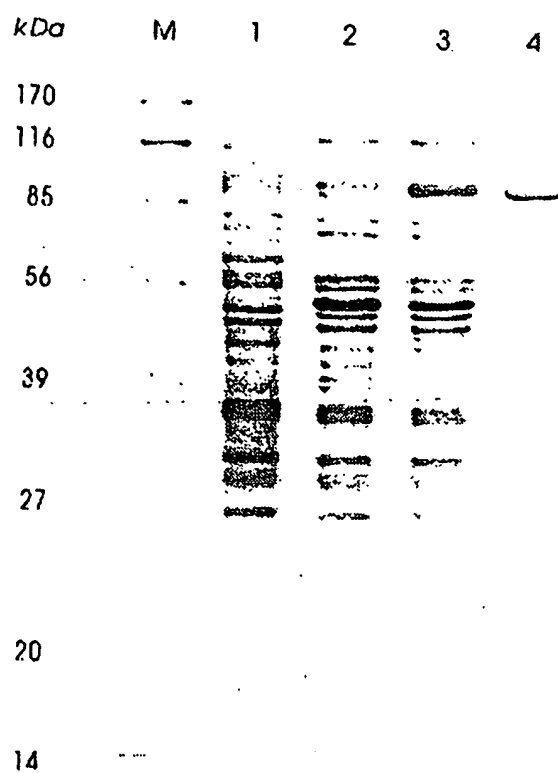


Fig. 3





**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.